

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư niêm mạc miệng (UTNMM) là một trong những ung thư thường gặp. Cho đến nay, UTNMM vẫn là mối quan tâm đối với sức khỏe cộng đồng do tỉ lệ tử vong cao, phát hiện lâm sàng trễ, tỉ lệ sống còn thấp và chưa có dấu ấn sinh học đặc hiệu. Dù vị trí của bướu dễ phát hiện nhưng trên thực tế lâm sàng đa số bệnh nhân đến khám ở giai đoạn trễ do bướu phát triển nhanh và dễ xâm lấn các cấu trúc xung quanh. Điều trị phối hợp đa mô thức thường được chỉ định gây ảnh hưởng nhiều đến chức năng, thẩm mỹ và tâm lý người bệnh.

Đa số UTNMM là carcinôm tế bào gai, do đó thuật ngữ UTNMM được dùng trong nghiên cứu này được hiểu là carcinôm tế bào gai. UTNMM thường xuất hiện trên nền biểu mô đã bị biến đổi. Theo thuyết “môi trường ung thư hóa”, toàn bộ niêm mạc miệng bị ảnh hưởng bởi chất sinh ung thư, cho dù niêm mạc có vẻ bình thường nhưng có thể đã có biến đổi phân tử để phát triển ác tính. Quá trình biến đổi từ niêm mạc miệng bình thường hay từ tổn thương tiền ung thư, loạn sản trở thành ung thư gọi là quá trình chuyển dạng ác tính.

Gần đây, một trong những mô hình được sử dụng nhiều nhất để giải thích cơ chế chuyển dạng ác tính và một số đặc điểm của ung thư, đặc biệt trong ung thư biểu mô, là quá trình chuyển đổi biểu mô - trung mô (EMT). EMT là một quá trình sinh học thuận nghịch cho phép tế bào biểu mô (là tế bào phân cực và kết dính với nhau) trải qua nhiều thay đổi sinh hóa để đạt được kiểu hình của tế bào trung mô (không phân cực và tách rời nhau) có khả năng di cư và xuyên qua màng đáy đến vị trí di căn. Sự hiện diện của EMT là yếu tố dự đoán tiên tri và tiên lượng UTNMM. Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu về EMT trong UTNMM.

Có nhiều yếu tố phân tử tham gia vào quá trình EMT. Nhờ EMT, tế bào biểu mô có khả năng tách rời nhau do mất các cầu nối liên bào (giảm biểu hiện E-cadherin), di chuyển qua màng đáy (hiện diện màng đáy biểu hiện laminin), xâm lấn mô đệm (biểu hiện vimentin). Đặc điểm EMT cũng được tìm thấy cả trong loạn sản biểu mô với giảm hay mất biểu hiện keratin 4 (dấu ấn biệt hóa biểu mô).

Nhằm góp phần hiểu rõ quá trình EMT xảy ra trong UTNMM và giúp ích cho công tác chẩn đoán, tiên lượng và hướng đến điều trị hiệu quả, nghiên cứu được thực hiện với các mục tiêu sau:

1. Xác định và so sánh tỉ lệ, mức độ biểu hiện hóa mô miễn dịch của hai dấu ấn biểu mô E-cadherin và keratin 4 trong UTNMM và trong loạn sản biểu mô miệng, niêm mạc miệng bình thường ở rìa bệnh phẩm mô ung thư; phân tích sự liên quan giữa biểu hiện của các dấu ấn này với các đặc điểm lâm sàng, giải phẫu bệnh của UTNMM.

2. Xác định tỉ lệ và mức độ biểu hiện hóa mô miễn dịch của dấu ấn màng đáy laminin 332 trong UTNMM; phân tích sự liên quan giữa biểu hiện laminin 332 với lâm sàng và giải phẫu bệnh của UTNMM.

3. Xác định tỉ lệ và mức độ biểu hiện hóa mô miễn dịch của dấu ấn trung mô vimentin trong UTNMM; phân tích sự liên quan giữa biểu hiện vimentin với lâm sàng và giải phẫu bệnh của UTNMM.

4. Phân tích sự liên quan biểu hiện của bốn dấu ấn EMT bao gồm E-cadherin, keratin 4, laminin 332 và vimentin trong UTNMM.

2. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

UTNMM là vấn đề y tế còn nặng nề về tỉ lệ mắc và tử vong cũng như di chứng về thể chất và tâm lý sau điều trị. Bất kể những tiến bộ trong nghiên cứu và chiến lược điều trị, tỉ lệ sống còn của bệnh nhân UTNMM vẫn thấp và không cải thiện đáng kể trong những thập niên qua.

Hiện nay, EMT được xem như cơ chế chủ yếu trong tiến triển ung thư biểu mô và liên quan đến đặc điểm ác tính của tế bào ung thư. Tuy nhiên, hiểu biết về EMT trong UTNMM vẫn chưa nhiều, các nghiên cứu về UTNMM báo cáo tỉ lệ rất thay đổi. Tại Việt nam, chưa có nghiên cứu tìm hiểu hiện tượng chuyển đổi biểu mô – trung mô trong ung thư niêm mạc miệng. Việc hiểu rõ các sự kiện phân tử của EMT là cần thiết nhằm tìm kiếm và thiết lập mục tiêu phân tử giúp phát hiện sớm, dự đoán diễn tiến ung thư cũng như định hướng phát triển chiến lược điều trị mới đặc hiệu.

Trong chẩn đoán, xếp loại mô học hiện tại vẫn là yếu tố tiên lượng tốt nhất trong tiến triển từ tiền ung thư sang ung thư cũng như xác định mức độ trầm trọng của ung thư và là cơ sở để đưa ra quyết định lâm sàng. Tuy nhiên, việc đánh giá mô học khá chủ quan và có sai số giữa các quan sát viên và giữa các lần quan sát. Trong khi đó, trên thực tế có những trường hợp loạn sản thấp tiến triển thành ung thư nhưng loạn sản mức độ cao hơn vẫn giữ nguyên trạng thái hoặc thậm chí thoái lui bất chấp yếu tố môi trường. Do vậy, không thể tiên đoán chính xác tổn thương nào có tiềm năng chuyển đổi ác tính cao hơn nếu chỉ dựa vào kết quả mô bệnh học truyền thống.

Trong điều trị, UTNMM có tỉ lệ tái phát tại chỗ cao do phẫu thuật cắt bỏ không đủ rộng. Đánh giá mô học rìa cắt phẫu thuật cho thấy sau khi đã cắt bỏ hoàn toàn bướu, không thể phát hiện được các tế bào ung thư còn sót lại bằng xét nghiệm mô học thường quy. Hơn nữa, có sự tái phát ở vị trí nguyên phát dù đã được chẩn đoán mô học không còn bướu. Do đó, việc sử dụng các dấu ấn phân tử nhằm xác định tế bào ác tính đóng vai trò quan trọng trong lựa chọn điều trị và giảm tỉ lệ tái phát ung thư.

Đến nay, tiên lượng và điều trị UTNMM vẫn dựa vào hệ thống phân loại TNM trên lâm sàng. Tuy nhiên, chỉ sử dụng hệ thống TNM có thể gây hạn chế trong xử trí vì ngay cả ung thư giai đoạn sớm T1 vẫn di căn hạch và tiến triển nhanh với kết cuộc tử vong. Nhiều dấu ấn phân tử đã được nghiên cứu liên quan đến kết quả điều trị UTNMM, tuy nhiên các kết quả không nhất quán và trái ngược nhau, hơn nữa thiếu bằng chứng cụ thể về lợi ích thực tiễn cũng như chi phí làm giới hạn khả năng ứng dụng các dấu ấn này trong thực hành lâm sàng thường quy. Vì vậy, cần bổ sung các dấu ấn tin cậy giúp phân loại ung thư tốt hơn dựa trên đặc điểm sinh học của bướu, hướng đến điều trị ứng hợp từng người bệnh ung thư.

3. Ý NGHĨA THỰC TIỄN VÀ ĐÓNG GÓP MỚI

Ứng dụng trong giảng dạy và nghiên cứu:

Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam khảo sát biểu hiện của 4 dấu ấn liên quan sự chuyển đổi biểu mô-trung mô (EMT) trong ung thư niêm mạc miệng. Các số liệu và hình ảnh nhuộm có thể được sử dụng trong giảng dạy giải phẫu bệnh RHM.

Thực hiện hóa mô miễn dịch khảo sát được một số đặc điểm phân tử của loạn sản niêm mạc miệng và bước đầu liên kết loạn sản với chuyển đổi biểu mô – trung mô giúp tìm hiểu cơ chế tiến triển ung thư, cũng như thấy rõ được bức tranh toàn cảnh từ niêm mạc miệng bình thường sang loạn sản và cuối cùng là ung thư niêm mạc miệng.

Nghiên cứu chứng minh có dấu hiệu của quá trình chuyển đổi biểu mô-trung mô trong ung thư niêm mạc miệng, góp phần bước đầu cung cấp dữ liệu trong nghiên cứu về quá trình chuyển đổi này trong cơ chế tiến triển cũng như xâm lấn và di căn của ung thư niêm mạc miệng ở người Việt Nam.

Ứng dụng trong thực tiễn và điều trị:

Thông qua nhuộm hóa mô miễn dịch keratin 4 cho thấy đây có thể là một phương pháp khách quan và hữu dụng, có thể hỗ trợ bác sĩ giải phẫu

bệnh trong chẩn đoán sớm loạn sản nhẹ giúp đưa ra hướng giải quyết đúng đắn các sang thương tiền ung thư và hỗ trợ thêm thông tin chẩn đoán mức độ loạn sản. Trên lâm sàng, nhuộm keratin 4 giúp xác định niêm mạc miệng bình thường ở rìa diện cắt từ đó xác định rìa diện cắt phẫu thuật đủ rộng và an toàn.

CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án có 143 trang, bao gồm các phần: mở đầu (3 trang), chương 1: tổng quan tài liệu (29 trang), chương 2: đối tượng và phương pháp nghiên cứu (27 trang), chương 3: kết quả (40 trang), chương 4: bản luận (39 trang), kết luận (3 trang), kiến nghị (1 trang), các công trình đã công bố liên quan đến luận án (1 trang). Luận án có 27 bảng, 12 biểu đồ, 33 hình, 1 sơ đồ. Phần tài liệu tham khảo gồm 190 tài liệu (8 tài liệu tiếng Việt, 182 tài liệu tiếng Anh). Ngoài ra, luận án có các phụ lục (17 trang).

NỘI DUNG

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Ung thư niêm mạc miệng (UTNMM) là một tân sinh ác tính xuất phát ở môi hoặc hốc miệng, bao gồm ung thư môi, lưỡi, nướu, khẩu cái, sàn miệng và niêm mạc má. Trên 90% UTNMM là ung thư biểu mô tế bào gai. UTNMM có mức độ biệt hóa khác nhau và xu hướng cao xâm lấn tại chỗ và di căn hạch.

Đa số UTNMM thường xuất hiện trên nền niêm mạc đã bị biến đổi được gọi là tổn thương tiền ung thư. Ở những sang thương này, một số loạn sản nhẹ tiến triển thành ung thư, trong khi loạn sản mức độ cao hơn vẫn giữ nguyên trạng thái hoặc thậm chí thoái lui bất chấp yếu tố môi trường. Không thể tiên đoán chính xác tổn thương nào có tiềm năng chuyển đổi ác tính cao hơn.

Tiến triển của ung thư biểu mô và đặc điểm ác tính của tế bào ung thư có cơ chế chủ yếu liên quan đến quá trình chuyển đổi biểu mô-trung mô (EMT). Khái niệm EMT được đề xướng lần đầu tiên bởi Greenburg và c.s. EMT là quá trình sinh học phức tạp và có thể đảo ngược, trong đó tế bào biểu mô thay đổi khả năng phân cực và khả năng kết dính để đạt được đặc tính trung mô có khả năng di cư mạnh, tiềm năng xâm lấn, kháng chết tế bào theo lập trình và tăng tạo các thành phần khung ngoại bào. EMT tạo điều kiện cho tế bào ung thư phá vỡ màng đáy, xâm nhập mô đệm và di căn. Tại vị trí di căn, tế bào trải qua quá trình chuyển đổi đảo ngược trung mô-biểu mô (MET) trở lại kiểu hình biểu mô để khu trú, kết dính và phát triển. EMT được xem như cơ chế chủ yếu trong tiến triển ung thư biểu mô và liên quan đến đặc điểm ác tính của tế bào ung thư. Sự

hiện diện của EMT là yếu tố dự đoán tiến triển và tiên lượng UTNMM, do đó phát hiện EMT hỗ trợ việc ra quyết định lâm sàng, chiến lược điều trị và tiên lượng của bệnh nhân.

Có nhiều yếu tố phân tử tham gia vào quá trình EMT. E-cadherin là dấu ấn sinh học đầu tiên và điển hình của EMT; keratin 4 là dấu ấn biệt hóa biểu mô với giảm hoặc mất biểu hiện trong loạn sản biểu mô; vimentin là sợi trung gian khung tế bào thường biểu hiện ở tế bào có kiểu hình trung mô, không biểu hiện trong tế bào biểu mô bình thường; biểu hiện vimentin trong tế bào biểu mô ác tính được xem như một dấu ấn EMT đáng tin cậy. EMT giúp tế bào biểu mô tách rời cầu nối liên bào, chuyển dạng và di chuyển qua màng đáy. Màng đáy là cấu trúc nâng đỡ tế bào biểu mô, có vai trò chính yếu trong duy trì kiểu hình biểu mô đồng thời ngăn ngừa sự di chuyển, xâm lấn và di căn của tế bào ung thư. Laminin là thành phần cấu tạo chính của màng đáy, góp phần quan trọng trong bệnh học ung thư khi giảm biểu hiện ở màng đáy và biểu hiện trong bào tương tế bào ung thư.

Các nghiên cứu trước đây trên thế giới báo cáo EMT liên quan với nguy cơ cao tái phát, tiên lượng kém, giảm tỉ lệ sống còn, biệt hoá kém, di căn hạch, đề kháng với xạ trị và hóa trị của tế bào ung thư. Ở Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về chuyển đổi biểu mô-trung mô (EMT) trong ung thư niêm mạc miệng.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu cắt ngang (mô tả và phân tích).

2.2. Đối tượng nghiên cứu:

Bệnh nhân UTNMM đến khám và điều trị tại Bệnh viện Ung Bướu Tp. Hồ Chí Minh được chẩn đoán xác định trước mổ là UTNMM và điều trị phẫu thuật UTNMM tại Khoa Ngoại 5 (Khoa Ngoại Đầu Cổ) từ tháng 01/2013 đến tháng 12/2015.

Tiêu chí chọn mẫu: Bệnh nhân được chọn vào mẫu nghiên cứu khi có đủ các yếu tố sau: (1) bệnh nhân từ 18 tuổi trở lên; (2) tổn thương lâm sàng là ung thư niêm mạc miệng nguyên phát; (3) chẩn đoán giải phẫu bệnh sinh thiết trước mổ là carcinôm tế bào gai; (4) được chỉ định điều trị phẫu thuật cắt rộng, chưa điều trị đặc hiệu ung thư; (5) giải phẫu bệnh sau mổ (bệnh phẩm mổ) là carcinôm tế bào gai; (6) có đủ mẫu bệnh phẩm sau mổ vùi sáp (khối sáp) để làm xét nghiệm giải phẫu bệnh và hóa mô miễn dịch; (7) có đầy đủ hồ sơ bệnh án; (8) đồng ý và hợp tác tham gia nghiên cứu.

Tiêu chí loại trừ: Bệnh nhân loại ra khỏi mẫu nghiên cứu khi có một trong những yếu tố sau: (1) ung thư vị trí khác lan hoặc di căn đến hốc miệng; (2) ung thư niêm mạc miệng kết hợp với ung thư thứ hai ở vị trí khác; (3) mẫu mô ung thư không đủ thành phần biểu mô và mô liên kết để khảo sát hóa mô miễn dịch; (4) mẫu bệnh phẩm mô không đủ thành phần mô tế bào gai ung thư và giao diện với niêm mạc miệng lành tính kế cận.

Cỡ mẫu nghiên cứu:

Cỡ mẫu tối thiểu được tính theo công thức:

$$N = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times p \times (1-p)}{d^2}$$

Với: p là tỷ lệ % UTNMM có biểu hiện hóa mô miễn dịch E-cadherin (42,11% theo Zhu 2018), keratin 4 (31% theo Enokida 2017), laminin 332 (56,67% theo Koshy 2012) và vimentin (66,1% theo Angadi 2016).

Cỡ mẫu tối thiểu trong nghiên cứu này là:

$$N (\text{E-cadherin}) = 116$$

$$N (\text{keratin 4}) = 101$$

$$N (\text{laminin}) = 117$$

$$N (\text{vimentin}) = 106$$

Sau cùng, tổng số mẫu UTNMM được chọn cho 4 dấu ấn sinh học trong nghiên cứu này là 130 trường hợp UTNMM. Trong số 130 mẫu bệnh phẩm mô cắt rộng UTNMM, có 44 trường hợp mẫu mô có kèm loạn sản biểu mô ở rìa diện cắt, có 111 trường hợp mẫu mô có kèm niêm mạc miệng bình thường ở rìa diện cắt.

Phương pháp chọn mẫu: thuận tiện.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Các biến số nghiên cứu

Bảng 2.1. Danh sách biến số nghiên cứu

<i>Tên biến số</i>	<i>Loại biến</i>	<i>Giá trị của biến số</i>
1. Đặc điểm dịch tễ - lâm sàng của UTNMM		
Giới tính	Nhị giá	1: Nam; 2: Nữ.
Tuổi	Liên tục	Số tuổi
Nhóm tuổi	Thứ tự	1: < 40 tuổi; 2: 40 – 70 tuổi; 3: >70 tuổi.
Thói quen nguy cơ	Nhị giá	0: Không; 1: Có
Vị trí ung thư	Danh định	1: Lưỡi; 2: Sàn miệng; 3: Nướu răng; 4: Khẩu cái; 5: Má; 6: Môi.
Kích thước bướu (T)	Thứ tự	1: ≤ 2 cm; 2: 2-4 cm; 3: > 4 cm; 4: xâm lấn
Di căn hạch (N)	Thứ tự	0: không có hạch; 1: 1 hạch cùng bên ≤ 3 cm; 2: 1 hạch cùng bên 3-6 cm hoặc nhiều hạch cùng bên < 6 cm hoặc hạch hai bên hay đối bên < 6 cm; 3: Hạch > 6 cm.
Di căn xa (M)	Nhị giá	1: Có; 2: Không.
Giai đoạn lâm sàng (UICC – 2009)	Thứ tự	1: Giai đoạn 1 (T1N0M0); 2: Giai đoạn 2 (T2N0M0); 3: Giai đoạn 3 (T1N1M0 hoặc T2N1M0 hoặc T3N0M0 hoặc T3N1M0). 4: Giai đoạn 4 (T4N0M0 hoặc T4N1M0 hoặc TxN2M0 hoặc TxN3M0 hoặc TxNxM1).
2. Đặc điểm giải phẫu bệnh UTNMM		
Grad mô học của carcinôm tế bào gai (WHO, 2005)	Thứ tự	1: Grad 1; 2: Grad 2; 3: Grad 3.
Loạn sản biểu mô (WHO, 2005)	Thứ tự	1: Loạn sản nhẹ; 2: Loạn sản vừa; 3: Loạn sản nặng.
3. Biểu hiện hóa mô miễn dịch của E-cadherin, vimentin, keratin 4 và laminin trong UTNMM, loạn sản và niêm mạc miệng bình thường		
Vị trí biểu hiện trong biểu mô	Danh định	1: Màng tế bào; 2: Bào tương; 3: Màng đáy.
Tỉ lệ biểu hiện (%)	Liên tục	Tỉ số tế bào biểu mô nhuộm miễn dịch dương tính trong tổng số tế bào biểu mô đếm được.
Mức độ biểu hiện E-cadherin ở màng tế	Nhị giá	0: < 90% (âm tính); 1: 90 – 100% (dương tính).

<i>Tên biến số</i>	<i>Loại biến</i>	<i>Giá trị của biến số</i>
bào biểu mô ung thư, loạn sản và bình thường (Zhu, 2018)		
Mức độ biểu hiện keratin 4 ở bào tương tế bào biểu mô ung thư, loạn sản và bình thường (Einokida, 2017)	Thứ tự	1: > 70% (bảo tồn biểu hiện K4); 2: 30-70% (mất một phần biểu hiện K4); 3: <30% (mất hoàn toàn biểu hiện K4).
Mức độ biểu hiện laminin 332 ở màng đáy của đám tế bào ung thư trong mô đệm (Sruthy, 2013)	Danh định	1: Có màng đáy, liên tục; 2: Có màng đáy, không liên tục; 3: Không màng đáy.
Mức độ biểu hiện laminin 332 trong bào tương tế bào ung thư (Junior, 2014)	Thứ tự	0: 0% (âm tính); 1: ≤ 10% (rời rạc); 2: 11-50% (nhuộm trung bình); 3: >50% (dương tính cao).
Mức độ biểu hiện vimentin ở màng tế bào và bào tương của tế bào ung thư (Akhtar, 2016)	Thứ tự	0: ≤5%; 1: 6 – 25%; 2: 26-50%; 3: 51 - 75%; 4: >75%.

2.3.2. Tiến trình thực hiện

(1) Tại Bệnh viện Ung Bướu Tp.HCM:

- Hỏi bệnh sử, khám lâm sàng.
- Ghi nhận dữ liệu lâm sàng, cận lâm sàng và chẩn đoán trong hồ sơ bệnh án vào phiếu thu thập thông tin.

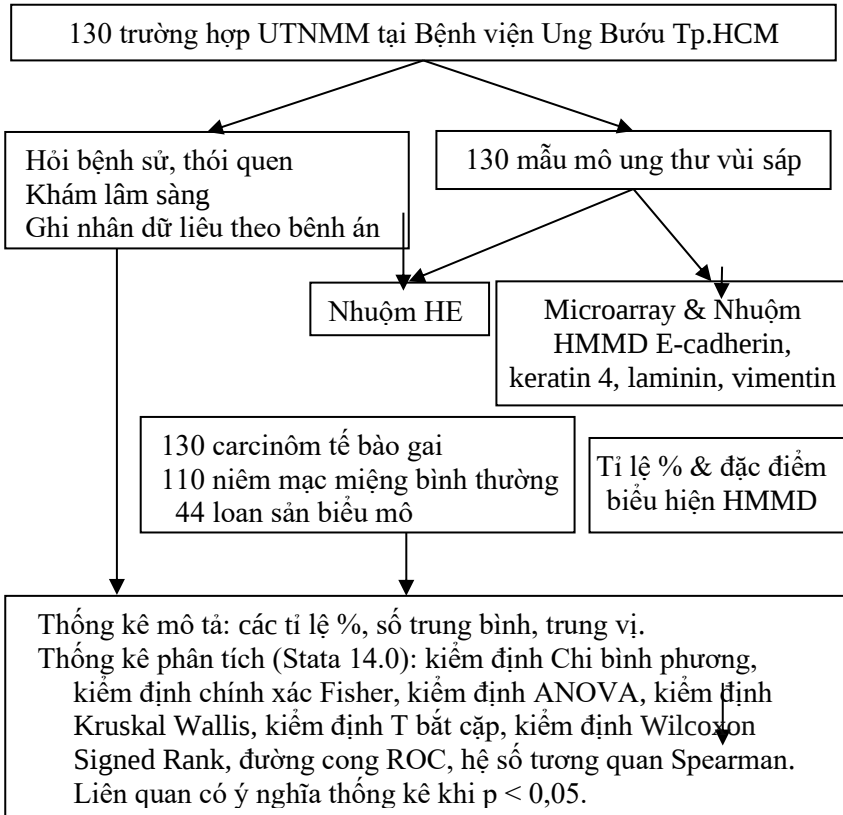
(2) Tại lab Giải phẫu bệnh, Khoa Nha, Đại học Y Nha Tokyo, Nhật Bản:

- Cắt lát mỏng mô, dán lát mô lên tiêu bản.
- Nhuộm Hematoxylin - Eosin (HE)
- Thực hiện microarray.
- Nhuộm hóa mô miễn dịch E-cadherin, keratin 4, laminin 332 và vimentin.

(3) Tại lab Giải phẫu bệnh Khoa Răng Hàm Mặt, Đại học Y Dược Tp.HCM:

Đọc kết quả HE và kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch, ghi nhận vào phiếu thu thập thông tin.

Tóm tắt quy trình nghiên cứu:



Sơ đồ 2.1. Quy trình nghiên cứu

2.3.3. Xử lý số liệu thống kê

Số liệu được nhập với phần mềm Microsoft Excel 2016 và được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm Stata 14.0.

Thống kê mô tả:

- Biến định tính (giới tính, nhóm tuổi, thói quen nguy cơ, vị trí tổn thương, giai đoạn bệnh, grad mô học, mức độ loạn sản, điểm số biểu hiện của E-cadherin, keratin 4, vimentin và laminin 332, biểu hiện mất liên tục ở màng đáy của laminin 332): số ca và tỉ lệ %.

- Biểu định lượng (tuổi, tỉ lệ tế bào biểu hiện E-cadherin, keratin 4, laminin 332 và vimentin): trung bình và độ lệch chuẩn, trung vị và khoảng tứ phân vị.

Thông kê phân tích:

- Các biến độc lập (biến nền): giới tính, tuổi, thói quen, các đặc điểm lâm sàng và giải phẫu bệnh của UTNMM.

- Biến phụ thuộc: tỷ lệ và mức độ tăng biểu hiện của vimentin; tỷ lệ và mức độ giảm biểu hiện của E-cadherin và keratin 4; biểu hiện mất liên tục của laminin 332 ở màng đáy quanh đám tế bào ung thư và mức độ biểu hiện laminin 332 trong bào tương tế bào ung thư.

- Mối liên quan giữa tình trạng tăng biểu hiện vimentin và giảm biểu hiện E-cadherin, keratin 4 và biểu hiện mất liên tục của laminin 332 ở màng đáy quanh đám tế bào ung thư và mức độ biểu hiện laminin 332 trong bào tương tế bào ung thư với các yếu tố tuổi, giới tính, thói quen, đặc điểm lâm sàng, giải phẫu bệnh trong UTNMM:

- Kiểm định Chi bình phương nếu $>80\%$ vọng trị >5 ; kiểm định chính xác Fisher nếu $>20\%$ vọng trị ≤ 5 để so sánh các tỉ lệ.

- Kiểm định ANOVA nếu phân phối chuẩn hoặc kiểm định Kruskal-Wallis nếu phân phối không chuẩn để so sánh các giá trị trung bình.

- Kiểm định T bất cặp hoặc kiểm định Wilcoxon Signed Rank so sánh giá trị trung bình của tỉ lệ tế bào dương tính giữa UTNMM và NMMBT trong cùng mẫu.

- Sử dụng hệ số tương quan Spearman để phân tích tương quan biểu hiện giữa từng cặp dấu ấn sinh học E-cadherin, keratin 4, laminin 332 và vimentin.

- Đường cong ROC phân tích độ đặc hiệu và độ nhạy để xác định lợi ích lâm sàng của các protein EMT trong nghiên cứu.

Tất cả các phép kiểm đều sử dụng độ tin cậy 95% và giá trị p: sự liên quan hay khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

Ngoài ra, nghiên cứu sử dụng hệ số tương quan nội tại ICC để đánh giá độ tin cậy của hai bác sĩ đánh giá kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch.

2.4. Kiểm soát sai lệch thông tin

Chọn mẫu: chỉ chọn vào nghiên cứu những ca UTNMM nguyên phát, chưa điều trị đặc hiệu ung thư và có chẩn đoán giải phẫu bệnh trước mổ và sau mổ là carcinôm tế bào gai.

Bệnh án: do nghiên cứu sinh thực hiện theo một mẫu thống nhất, hỏi kỹ bệnh sử, thăm khám, ghi nhận chẩn đoán bệnh dựa trên lâm sàng và giải phẫu bệnh theo hồ sơ bệnh án của bệnh viện đã hội chẩn trước khi điều trị ung thư.

Lấy mẫu mô bệnh phẩm đúng quy cách: Mẫu mô do bác sĩ phẫu thuật trực tiếp cắt khi phẫu thuật cho bệnh nhân ung thư, mô bệnh phẩm được ngâm trong dung dịch formol 10% đậm trung tính đảm bảo thời gian cố định (6 - 24g) đảm bảo chất lượng cho mẫu xét nghiệm giải phẫu bệnh và hóa mô miễn dịch.

Độ tin cậy của xét nghiệm:

- Cắt lát mỏng mô, dán lên tiêu bản, nhuộm HE và nhuộm hóa mô miễn dịch được thực hiện theo qui trình chuẩn của Lab Giải phẫu bệnh Bộ môn Bệnh học miệng, Khoa Nha, Đại học Y Nha Tokyo (Nhật Bản) do nghiên cứu sinh thực hiện.

- Nghiên cứu sinh đã được huấn luyện định chuẩn qua hai khóa học: từ 21/7/2014 đến 20/1/2015 đạt Chứng nhận định hướng Giải phẫu bệnh do Bệnh viện Ung bướu Tp.HCM cấp; và từ 10/5/2014 đến 10/5/2015 đạt Chứng chỉ định hướng chuyên khoa Giải phẫu bệnh trong Răng Hàm Mặt do Đại học Y Dược Tp.HCM cấp (Phụ lục 4).

- Đánh giá kết quả giải phẫu bệnh do một bác sĩ Giải phẫu bệnh RHM và nghiên cứu sinh đọc độc lập với nhau, so sánh với kết quả của bác sĩ giải phẫu bệnh của Bệnh viện Ung Bướu Tp.HCM. Trường hợp không thống nhất kết quả, giải quyết bằng cách đọc trên kính nhiều đầu cho đến khi đạt được sự đồng thuận.

- Đánh giá kết quả hóa mô miễn dịch do nghiên cứu sinh và một bác sĩ Giải phẫu bệnh RHM ĐHYD Tp.HCM đọc độc lập với nhau. Trường hợp kết quả khác biệt, nghiên cứu sinh và bác sĩ giải phẫu bệnh RHM cùng hội chẩn với bác sĩ giải phẫu bệnh của Bệnh viện Ung Bướu Tp.HCM và thống nhất kết quả qua kính hiển vi nhiều đầu. Sau 2 tuần, nghiên cứu sinh chọn ngẫu nhiên 20% số ca đọc lại để kiểm tra độ kiên định của chẩn đoán, kết quả đạt 100%.

2.4. Vấn đề y đức trong nghiên cứu

- Đề cương nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Đại học Y Dược Tp.HCM và đã được Hội đồng Đạo đức chấp thuận các khía cạnh đạo đức vào ngày 22 tháng 9 năm 2014 số 216/ĐHYD-HĐ.

- Bệnh nhân được giải thích rõ về mục tiêu nghiên cứu, cung cấp đầy đủ các thông tin có liên quan, giải thích rõ các vấn đề bệnh nhân còn thắc

mắc. Chỉ tiến hành khi bệnh nhân hiểu, đồng ý tham gia nghiên cứu và ký tên vào giấy đồng thuận; hợp tác trong phỏng vấn, làm bệnh án và lưu trữ thông tin. Bệnh nhân có quyền đồng ý, từ chối hoặc rút khỏi nghiên cứu bất cứ khi nào, với bất cứ lý do gì.

- Nghiên cứu hoàn toàn không can thiệp vào quá trình điều trị bệnh, chỉ sử dụng mô bệnh phẩm đã vùi sấp sau phẫu thuật cắt rộng ung thư trong kế hoạch điều trị của bệnh viện.

- Bảo mật các thông tin của bệnh nhân bằng cách mã hóa dữ liệu thu thập.

- Mẫu mô bệnh phẩm được cắt lát, nhuộm HE, nhuộm hóa mô miễn dịch E-cadherin, keratin 4, laminin 332 và vimentin, sau đó đọc và phân tích kết quả; không được sử dụng cho mục đích nào khác.

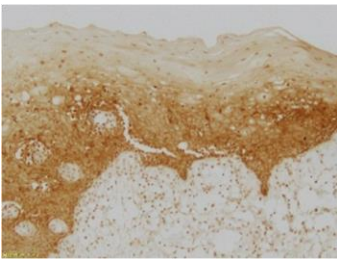
- Toàn bộ chi phí xét nghiệm hóa mô miễn dịch do người nghiên cứu chi trả.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ

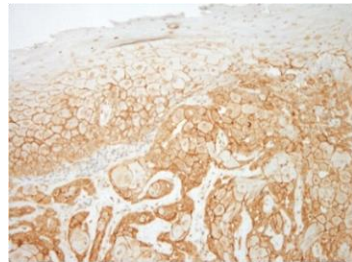
3.1. Tỷ lệ biểu hiện E-cadherin và keratin 4 trong ung thư, loạn sản và niêm mạc miệng bình thường

3.1.1. Tỷ lệ và mức độ biểu hiện E-cadherin

3.1.1.1. Biểu hiện E-cadherin trong ung thư và so với NMMBT



*A. E-cadherin dương tính mạnh
100% ở NMMBT (hồ sơ 24197/14)*



*B. Bảo tồn E-cad trong mô
ung thư (số hồ sơ 15148/15)*

Hình 3.1. Biểu hiện E-cadherin trong NMMBT và ung thư

Tỉ lệ % trung bình biểu hiện E-cadherin trong UTNMM là $94,9 \pm 13,5\%$, khác biệt có ý nghĩa so với tỉ lệ $99,6 \pm 1,7\%$ trong NMMBT ($p < 0,001$). Mức độ biểu hiện E-cadherin cũng khác biệt có ý nghĩa giữa UTNMM và NMMBT ($p < 0,001$) (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Biểu hiện E-cadherin trong UTNMM và so với NMMBT

Biểu hiện E-cadherin	Ung thư N=130 số ca (%)	Bình thường N=111 số ca (%)	p
Tỉ lệ % E-cad			
<i>Trung bình (độ lệch chuẩn)</i>	94,9 (13,5)	99,6 (1,7)	<0,001^a
Tỉ lệ % E-cad			
<i>Trung vị (khoảng tứ vị)</i>	100 (95 - 100)	100 (100 - 100)	<0,001^b
Mức độ E-cad			
Độ 0 ($\leq 90\%$)	18 (13,8)	0 (0)	<0,001^c
Độ 1 ($> 90\%$)	112 (86,2)	111 (100)	

^a Kiểm định t; ^b Kiểm định Wilcoxon Ranksum; ^c Kiểm định chính xác Fisher

3.1.1.2. So sánh tỉ lệ và mức độ biểu hiện E-cadherin trong ung thư, loạn sản và niêm mạc miệng bình thường

Tỉ lệ và mức độ biểu hiện E-cadherin khác biệt có ý nghĩa giữa ung thư, loạn sản và NMMBT ($p < 0,05$) (Bảng 3.3):

- Tỉ lệ % trung bình biểu hiện E-cadherin trong NMMBT là $99,6 \pm 1,7\%$, giảm $98,8 \pm 3,6\%$ trong loạn sản và tiếp tục giảm còn $94,9 \pm 13,5\%$ trong ung thư.
- Tất cả 100% NMMBT biểu hiện E-cadherin mức độ 1 (độ 1 – Ecad). Giảm biểu hiện E-cadherin (độ 0 - Ecad) xảy ra trong loạn sản nặng (4,5%) và trong ung thư (13,8%).

Bảng 3.3. So sánh biểu hiện E-cadherin trong ung thư, loạn sản, NMMBT

Biểu hiện E-cadherin	UTNMM N=130 số ca (%)	Loạn sản N=44 số ca (%)	Bình thường N=111 số ca (%)	p
Tỉ lệ % E-cad				
<i>Trung bình (độ lệch chuẩn)</i>	94,9 (13,5)	98,8 (3,6)	99,6 (1,7)	0,015^a
Tỉ lệ % E-cad				
<i>Trung vị (khoảng tứ vị)</i>	100 (95 - 100)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	0,015^b
Mức độ E-cad				
Độ 0 ($\leq 90\%$)	18 (13,8)	2 (4,5)	0 (0)	<0,001^c
Độ 1 ($> 90\%$)	112 (86,2)	42 (95,5)	111 (100)	

^a Phân tích ANOVA; ^b Kiểm định Kruskal Wallis; ^c Kiểm định chính xác Fisher

3.1.1.3. Liên quan giữa biểu hiện E-cadherin với lâm sàng, giải phẫu bệnh ung thư niêm mạc miệng

Không có sự khác biệt rõ về mức độ biểu hiện E-cadherin giữa nam và nữ, giữa các nhóm tuổi, các thói quen nguy cơ, các vị trí ung thư, các kích thước bướu nguyên phát, tình trạng di căn hạch và giai đoạn ung thư ($p > 0,05$).

Có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa mức độ biểu hiện E-cadherin theo độ ác tính (grad) mô học của UTNMM: Giảm biểu hiện E-cadherin (độ 0) ($< 90\%$) từ 7,1% trong grad 1, tăng dần 15,6% trong grad 2 đến 40% trong grad 3 ($p < 0,05$).

3.1.2. Tỷ lệ và mức độ biểu hiện keratin 4

3.1.2.1. Biểu hiện keratin 4 trong ung thư và so với niêm mạc miệng bình thường

a. Biểu hiện keratin 4 trong niêm mạc miệng bình thường

Biểu hiện keratin 4 (K4) trong toàn bộ mẫu NMMBT nhất quán về mức độ và vị trí. Trong NMMBT, tất cả tế bào gai cho đến lớp bề mặt biểu mô biểu hiện K4 dương tính với cường độ mạnh, liên tục và đồng nhất; các tế bào đáy và cận đáy không biểu hiện K4. Về mức độ, đa số NMMBT (70 ca; 63,1%) biểu hiện 100% K4 dương tính, các ca còn lại (41 ca; 36,9%) có giảm biểu hiện K4 nhưng vẫn bảo tồn được trên 75% cho nên tất cả NMMBT biểu hiện K4 độ 1.

Tỷ lệ biểu hiện keratin 4 trong NMMBT không khác nhau rõ giữa các nhóm tuổi, giữa nam và nữ, giữa các vị trí ung thư trong miệng và giữa các thói quen nguy cơ ($p > 0,05$).

b. Keratin 4 trong ung thư niêm mạc miệng

Hầu hết tế bào ung thư mất protein keratin 4 nên biểu hiện keratin 4 bị giảm rất nhiều, đa số UTNMM (93,1%) biểu hiện K4 dưới 30% (độ 3); chỉ có 8 ca (6,1%) biểu hiện K4 từ 30-50% (độ 2), và 1 ca (0,8%) còn bảo tồn 90% K4 (độ 1).

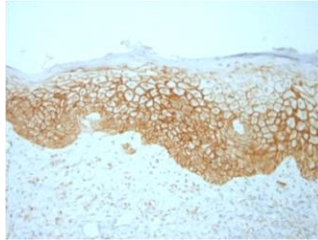
c. So sánh biểu hiện keratin 4 trong ung thư với NMMBT

Tỷ lệ và mức độ biểu hiện keratin 4 trong UTNMM khác biệt rất có ý nghĩa so với trong NMMBT ($p < 0,001$) (Bảng 3.4). Tỷ lệ trung bình keratin dương tính ở NMMBT là 94,1%, bị giảm rất nhiều ở UTNMM trung bình 6,3%, trung vị 0% ($p < 0,001$). Phân tích thống kê cho thấy tỷ lệ mất biểu hiện keratin trong UTNMM độc lập, không bị ảnh hưởng bởi tỷ lệ biểu hiện K4 trong NMMBT ($p > 0,05$).

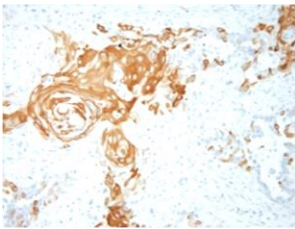
Bảng 3.4. Biểu hiện keratin 4 trong ung thư và so với NMMBT

Biểu hiện keratin 4	Ung thư N=130	Bình thường N=111	p
Tỉ lệ % keratin 4			
Trung bình (độ lệch chuẩn)	6,3 (12,7)	94,1 (8,4)	<0,001
Trung vị (khoảng tứ vị)	0 (0 - 5)	100 (90 - 100)	
Mức độ keratin 4			<0,001
Độ 1 ($\geq 70\%$)	1 (0,8)	111 (100)	
Độ 2 (30-70%)	8 (6,1)	0 (0)	
Độ 3 ($< 30\%$)	121 (93,1)	0 (0)	

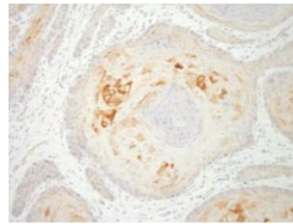
Kiểm định Wilcoxon Signed Rank



A. Biểu hiện keratin 4 trong NMMBT (số hồ sơ 11386/15)



B. Tế bào ung thư biểu hiện keratin 4 (số hồ sơ 2923/15)



C. Tế bào ung thư giảm biểu hiện keratin 4 (hồ sơ 10932/14)

Hình 3.2. Biểu hiện keratin 4 trong NMMBT và UTNMM

Tất cả 111 ca NMMBT biểu hiện K4 cao từ 75 - 100% (độ 1). Tuy nhiên, trong 130 ca ung thư, tỉ lệ % K4 dương tính giảm rất nhiều, thậm chí có đến 85 ca (65,4%) biểu hiện K4 chưa tới 5% (độ 3); trong đó 68 ca (52,3%) mất hoàn toàn và 17 ca (13,1%) biểu hiện từ 1 - 4%.

Có 45 ca (34,6%) ung thư biểu hiện K4 trên 5%, bao gồm 1 ca (0,8%) độ 1; 8 ca (6,1%) độ 2 và 36 ca (27,7%) độ 3. Sự khác biệt này rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

3.1.2.2. Biểu hiện keratin 4 trong loạn sản và so với niêm mạc miệng bình thường

Tỉ lệ trung bình keratin 4 dương tính cao 94,8% trong NMMBT, nhưng giảm rất nhiều trong loạn sản biểu mô với tỉ lệ biểu hiện chỉ còn 23,3%. Tất cả NMMBT biểu hiện K4 từ 80 - 100% (độ 1); trong khi hầu hết loạn sản (97,7%) giảm biểu hiện K4, chủ yếu ở độ 2 và độ 3. Sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) (Bảng 3.5).

Bảng 3.5. Biểu hiện keratin 4 trong loạn sản và NMMBT

Biểu hiện keratin 4	Loạn sản N = 44 số ca (%)	Bình thường N = 111 số ca (%)	p
Tỉ lệ % keratin 4			
<i>Trung bình (độ lệch chuẩn)</i>	23,3 (20,0)	94,8 (7,3)	< 0,001
Mức độ keratin 4			< 0,001
Độ 1 ($\geq 70\%$)	1 (2,3)	44 (100)	
Độ 2 (30-70%)	17 (38,6)	0 (0)	
Độ 3 ($< 30\%$)	26 (59,1)	0 (0)	

Kiểm định Wilcoxon Signed Rank

3.1.2.3. So sánh biểu hiện keratin 4 trong ung thư, loạn sản và niêm mạc miệng bình thường

Bảng 3.7. So sánh biểu hiện keratin 4 trong ung thư, loạn sản và niêm mạc miệng bình thường

Biểu hiện keratin 4	Ung thư N=130 số ca (%)	Loạn sản N=44 số ca (%)	Bình thường N=111 số ca (%)	p
Tỉ lệ % K4 Trung bình				
<i>(độ lệch chuẩn)</i>	6,3 (12,7)	23,3 (20,0)	94,1 (8,5)	<0,001^a
Mức độ K4				
Độ 1 ($\geq 70\%$)	1 (0,8)	0 (0)	111 (100)	<0,001^b
Độ 2 (30-70%)	7 (5,4)	15 (34,1)	0 (0)	
Độ 3 ($< 30\%$)	122 (93,8)	29 (65,9)	0 (0)	

^a Kiểm định ANOVA; ^bKiểm định chính xác Fisher

Tỉ lệ và mức độ biểu hiện keratin 4 khác biệt rất có ý nghĩa giữa ung thư, loạn sản niêm mạc miệng với niêm mạc miệng bình thường ($p < 0,001$). Tất cả 100% NMMBT biểu hiện keratin 4 ở độ 1; trong khi đó mất biểu hiện keratin 4 xảy ra ở mô loạn sản và ung thư, đa số loạn sản

(65,9%) và hầu hết mô ung thư (93,8%) mất keratin 4 nhiều, biểu hiện độ 3 (Bảng 3.7).

3.1.2.4. Liên quan giữa biểu hiện keratin 4 với lâm sàng, giải phẫu bệnh ung thư niêm mạc miệng

Các mức độ biểu hiện keratin 4 trong ung thư niêm mạc miệng khác nhau không có ý nghĩa thống kê về tuổi, thói quen, vị trí ung thư, kích thước bướu nguyên phát, tình trạng di căn hạch, giai đoạn ung thư, độ ác tính mô học của ung thư ($p > 0,05$).

3.1.3. Xác định lợi ích lâm sàng của E-cadherin và keratin 4 qua phân tích đường cong ROC về độ nhạy và đặc hiệu

Đường cong ROC là biểu đồ minh họa trình bày kiểm định ở các ngưỡng phân biệt khác nhau. Đường cong này xác định điểm cắt tối ưu để giảm thiểu tỉ lệ dương tính giả và âm tính giả bằng cách tối đa hoá độ nhạy và độ đặc hiệu. Kiểm định này được sử dụng trong phân loại hay xác định tiên lượng.

Trong nghiên cứu này, điểm số vùng dưới đường cong được sử dụng để đánh giá khả năng tiên đoán phân biệt giữa UTNMM với loạn sản, giữa UTNMM với NMMBT và giữa loạn sản với NMMBT.

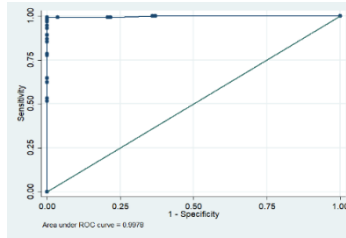
3.2.3.1. Giá trị chẩn đoán phân biệt của biểu hiện E-cadherin

Diện tích dưới đường cong ROC cho biết trị số này là 0,61 với độ nhạy 95,5%, độ đặc hiệu 25,38%, giá trị tiên đoán dương 86,85%, giá trị tiên đoán âm 52,22% nên biểu hiện E-cadherin ít có ý nghĩa trong việc phân định mô ung thư và mô niêm mạc miệng bình thường. Mặt khác, diện tích dưới đường cong ROC cho biết trị số này là 0,57 với độ nhạy 100% nhưng độ đặc hiệu là 0% cho thấy E-cadherin không có ý nghĩa phân biệt mô ung thư với mô loạn sản.

3.1.3.2. Giá trị chẩn đoán phân biệt của keratin 4

a. Biểu hiện của keratin 4 phân biệt mô ung thư với bình thường

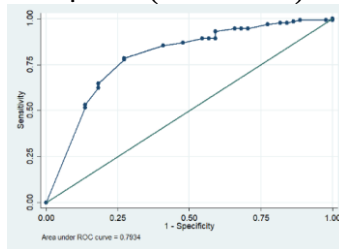
Diện tích dưới đường cong trong phân tích ROC chức năng phân biệt giữa UTNMM với NMMBT là 0,99 cho thấy keratin 4 một dấu ấn rất chính xác và biểu hiện keratin 4 rất có ý nghĩa trong việc phân định mô ung thư với mô niêm mạc miệng bình thường. Với độ nhạy 99,23% và độ đặc hiệu 100%, giá trị tiên đoán dương 100% và giá trị tiên đoán âm 99,11% cho biết nếu sử dụng keratin 4 để chẩn đoán ung thư thì khả năng keratin 4 xác định người đó bị ung thư là 99,23% (Biểu đồ 3.2).



Biểu đồ 3.2. Giá trị biểu hiện keratin 4 trong chẩn đoán phân biệt mô ung thư với mô niêm mạc miệng bình thường

b. Biểu hiện của keratin 4 phân biệt mô ung thư với mô loạn sản

Diện tích dưới đường cong ROC cho biết trị số này là 0,79 với độ nhạy 94,62%, độ đặc hiệu 34,09%, giá trị tiên đoán dương 80,92% và giá trị tiên đoán âm 68,18% nên keratin 4 có thể có ý nghĩa trong việc phân định mô ung thư với mô loạn sản (Biểu đồ 3.3).



Biểu đồ 3.3. Giá trị biểu hiện keratin 4 trong chẩn đoán phân biệt mô ung thư với mô loạn sản

3.2. Biểu hiện hóa mô miễn dịch của laminin 332

3.2.1. Tỷ lệ biểu hiện laminin 332 ở màng đáy đám tế bào ung thư

Kết quả biểu hiện laminin 332 ở màng đáy các đám tế bào ung thư:

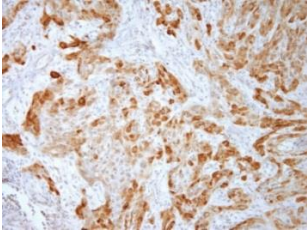
- 20% có màng đáy liên tục;
- 62% có màng đáy nhưng không liên tục;
- 18% không có màng đáy.

Như vậy, đa số trường hợp UTNMM có giảm hoặc không biểu hiện laminin 332 ở màng đáy, chiếm tỉ lệ 80%.

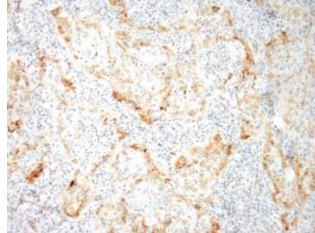
3.2.2. Tỷ lệ và mức độ biểu hiện laminin 332 trong bào tương các tế bào ung thư

Tỉ lệ trung bình biểu hiện laminin 332 trong bào tương các tế bào ung thư là 31,7%, với các mức độ biểu hiện sau:

- 5% độ 0 (laminin 332 bào tương âm tính: 0%);
- 25% độ 1 (laminin 332 bào tương dương tính yếu 1 - 10%);
- 49% độ 2 (laminin 332 bào tương dương tính vừa 11-50%);
- 21% độ 3 (laminin 332 bào tương dương tính mạnh > 50%).



A. Biểu hiện laminin 332 dương tính mạnh (độ 3) trong bào tương tế bào ung thư (90%) và liên tục ở màng đáy (số hồ sơ 5077/15)



B. Biểu hiện laminin 332 dương tính vừa (30%) (độ 2) và liên tục ở màng đáy (số hồ sơ 2662/15)

Hình 3.3. Biểu hiện laminin 332 trong bào tương các tế bào ung thư và ở màng đáy quanh các đám tế bào ung thư trong mô liên kết

3.2.3. Liên quan giữa biểu hiện laminin 332 với lâm sàng, giải phẫu bệnh ung thư

Biểu hiện laminin 332 ở màng đáy của đám tế bào ung thư và trong bào tương các tế bào ung thư không khác biệt rõ giữa nam và nữ, giữa các nhóm tuổi, các thói quen nguy cơ, các vị trí ung thư, các kích thước bướu, tình trạng di căn hạch và các giai đoạn ung thư ($p > 0,05$).

Có sự khác biệt ý nghĩa thống kê trong biểu hiện laminin 332 theo độ ác tính (grad) mô học của carcinôm tế bào gai:

Tỉ lệ ung thư không có màng đáy quanh đám tế bào ung thư tăng dần từ grad 1 (5,4%), đến grad 2 (25%) và cao nhất ở grad 3 (40%) ($p < 0,05$).

Biểu hiện laminin 332 độ 2 và 3 ($\geq 11\%$) tăng dần từ grad 1 (64,3%) đến grad 2 (70,3%) và cao nhất trong grad 3 (90%); ngược lại biểu hiện độ 0 và 1 ($\leq 10\%$) giảm dần từ nhóm grad 1 (35,7%) sang grad 2 (29,7%) và thấp nhất ở nhóm grad 3 (10%) ($p < 0,05$).

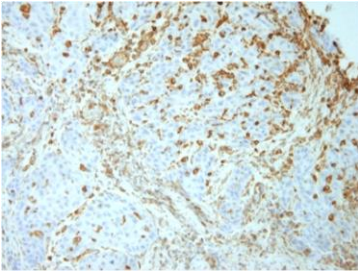
3.3. Biểu hiện hóa mô miễn dịch của vimentin trong ung thư niêm mạc miệng

3.3.1. Tỉ lệ và mức độ biểu hiện vimentin trong UTNMM

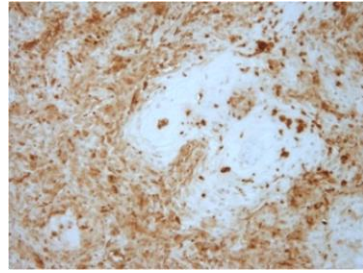
Nhuộm hóa mô miễn dịch cho kết quả 47% UTNMM có tế bào gai ác tính biểu hiện dấu ấn trung mô vimentin dương tính, chủ yếu dương tính

ở mức độ yếu (25% độ 1) và mức độ vừa (14% độ 2), ít gặp dương tính độ 3 (7%) và độ 4 (1%):

- 53% độ 0 (biểu hiện vimentin < 5%);
- 25% độ 1 (vimentin dương tính yếu 5 - 25%);
- 14% độ 2 (vimentin dương tính vừa 26 - 50%);
- 7% độ 3 (vimentin dương tính khá cao 50 - 75%);
- 1% độ 4 (vimentin dương tính cao >75%).



A. Vimentin dương tính độ 1
(số hồ sơ 12764/15)



B. Vimentin dương tính độ 3
(số hồ sơ 20632/14)

Hình 3.4. Biểu hiện vimentin trong ung thư niêm mạc miệng

3.3.2. Liên quan giữa biểu hiện vimentin với lâm sàng, giải phẫu bệnh ung thư

Biểu hiện vimentin trong UTNMM không có sự khác biệt theo giới tính, tuổi, thói quen nguy cơ, vị trí và kích thước ung thư nguyên phát, tình trạng di căn hạch và giai đoạn ung thư ($p < 0,05$). Tuy nhiên, có sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê trong biểu hiện của vimentin theo độ ác tính mô học của ung thư ($p < 0,001$). Grad mô học càng cao, biểu hiện vimentin càng cao. Biểu hiện vimentin tăng dần từ 34% ở nhóm grad 1 đến 52% ở nhóm grad 2 và cao nhất 90% nhóm grad 3.

3.4. Liên quan giữa 4 dấu ấn EMT trong ung thư niêm mạc miệng

Mối liên quan giữa các dấu ấn EMT được đánh giá đối với các tổn thương UTNMM bằng cách sử dụng hệ số tương quan với biểu hiện lần lượt keratin 4, E-cadherin và sau cùng laminin 332 làm chuẩn. Với keratin 4 làm chuẩn, biểu hiện keratin 4 không liên quan với biểu hiện E-cadherin, laminin 332 và vimentin ($p > 0,05$) (Bảng 3.8).

Bảng 3.8. Liên quan giữa biểu hiện keratin 4 với E-cadherin, laminin, vimentin trong ung thư niêm mạc miệng

UTNMM	Keratin 4			P	Tương quan Spearman R
	Độ 1	Độ 2	Độ 3		
E-cadherin				0,356	0,08
Độ 0	0 (0)	2 (11,1)	16 (88,9)		
Độ 1	1 (0,9)	5 (4,5)	106 (94,6)		
Laminin				0,197	0,19
Độ 0	0 (0)	1 (14,3)	6 (85,7)		
Độ 1	1 (3,0)	3 (9,1)	29 (87,9)		
Độ 2	0 (0)	3 (4,8)	60 (95,2)		
Độ 3	0 (0)	0 (0)	27 (100)		
Vimentin				0,959	0,11
Độ 0	1 (1,4)	5 (7,2)	63 (91,3)		
Độ 1	0 (0)	1 (3,0)	32 (97,0)		
Độ 2	0 (0)	1 (5,6)	17 (94,4)		
Độ 3/4	0 (0)	0 (0)	10 (100)		

Kiểm định chính xác Fisher

Khi sử dụng E-cadherin làm chuẩn để so sánh, biểu hiện của E-cadherin trong UTNMM không có mối liên quan với biểu hiện của laminin 332 trong bào tương nhưng liên quan có ý nghĩa với biểu hiện của vimentin nhưng với tương quan nghịch ($p < 0,05$); tuy nhiên, hệ số tương quan Spearman thấp ($R = -0,2$) (Bảng 3.9).

Bảng 3.9. Liên quan E-cadherin với laminin, vimentin trong ung thư

UTNMM	E-cadherin		P	Tương quan Spearman R
	Độ 0	Độ 1		
Laminin 332			0,292	0,05
Độ 0	2 (28,6)	5 (71,4)		
Độ 1	3 (9,1)	30 (90,9)		
Độ 2	11 (17,5)	52 (82,5)		
Độ 3	2 (7,4)	25 (92,6)		
Vimentin			0,029	-0,20
Độ 0	5 (7,2)	64 (92,8)		
Độ 1	6 (18,2)	27 (81,8)		
Độ 2	6 (33,3)	12 (66,7)		
Độ 3	1 (10)	9 (90)		

Kiểm định chính xác Fisher

Với laminin 332 làm chuẩn để so sánh cho thấy có mối tương quan thuận giữa biểu hiện laminin 332 trong bào tương và biểu hiện của vimentin ($p < 0,05$); tuy nhiên, hệ số tương quan Spearman không cao ($R = 0,3$) (Bảng 3.10).

Bảng 3.10. Liên quan biểu hiện laminin 332 và vimentin trong ung thư

Ung thư	Vimentin				P	Tương quan Spearman R
	Độ 0	Độ 1	Độ 2	Độ 3/4		
Laminin					0,045	0,30
Độ 0	5 (71,4)	2 (28,6)	0 (0)	0 (0)		
Độ 1	22 (66,7)	6 (18,2)	5 (15,2)	0 (0)		
Độ 2	34 (54,0)	18 (28,6)	6 (9,5)	5 (7,9)		
Độ 3	8 (29,6)	7 (25,9)	7 (25,9)	5 (18,5)		

Kiểm định chính xác Fisher

KẾT LUẬN

1. Biểu hiện của hai dấu ấn biểu mô E-cadherin và keratin 4 trong ung thư, loạn sản và niêm mạc miệng bình thường; phân tích sự liên quan với lâm sàng và giải phẫu bệnh.

- Biểu hiện của E-cadherin:**

Tỉ lệ biểu hiện E-cadherin trong UTNMM là 94,9% (13,8% độ 0 và 86,2% độ 1); trong LSNMM là 98,8% (4,5% độ 0 và 95,5% độ 1); trong NMMBT là 99,6% (100% độ 1). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Trong loạn sản biểu mô miệng, tỉ lệ biểu hiện E-cadherin giảm có ý nghĩa ($p < 0,05$) nhưng mức độ biểu hiện vẫn bảo tồn gần tương đương với NMMBT. Trong khi đó, UTNMM có tỉ lệ và mức độ biểu hiện E-cadherin giảm nhiều so với NMMBT ($p < 0,001$).

Giảm biểu hiện E-cadherin liên quan với tăng độ ác tính mô học ung thư ($p < 0,05$). Ung thư có độ ác tính mô học càng cao thì càng giảm biểu hiện E-cadherin.

- Biểu hiện của keratin 4:**

Tỉ lệ biểu hiện keratin 4 trong UTNMM là 7% với các mức độ 2,3% độ 1; 7,7% độ 2 và 90% độ 3; trong loạn sản là 23,3% với 2,3% độ 1; 38,6% độ 2 và 59,1% độ 3 khác biệt rất có ý nghĩa so với trong NMMBT biểu hiện tỉ lệ 94,1% và 100% ở độ 1 ($p < 0,001$).

Biểu hiện keratin 4 giảm rất nhiều trong UTNMM so với NMMBT ($p < 0,001$). Nhuộm hóa mô miễn dịch keratin 4 có thể giúp phân biệt mô niêm mạc miệng lành - ác về mặt sinh học một cách khách quan và rõ ràng, giúp nhận diện ranh giới niêm mạc miệng bình thường và ung thư để xác định rìa phẫu thuật có an toàn hay không.

Keratin 4 giảm biểu hiện rõ trong loạn sản, cho dù là loạn sản nhẹ, khác biệt có ý nghĩa so với NMMBT ($p < 0,001$). Do đó, keratin 4 cũng là một dấu ấn sinh học khách quan giúp phân biệt loạn sản với biểu mô miệng bình thường. Khi biểu hiện keratin 4 dương tính giảm nhiều còn dưới 30% (độ 3) gợi ý khả năng loạn sản nặng, ngược lại keratin 4 trên 70% (độ 1) gợi ý niêm mạc miệng bình thường, keratin 4 từ 30 - 69% (độ 2) thường là loạn sản nhẹ và vừa. Kết quả này cũng gợi ý bất thường K4 xảy ra sớm trong quá trình sinh ung thư.

Biểu hiện keratin 4 khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo các yếu tố lâm sàng và độ ác tính mô học của UTNMM ($p > 0,05$) cho thấy tính nhất quán về tình trạng mất biểu hiện K4 trong UTNMM, gợi ý K4 có thể là một dấu ấn sinh học chẩn đoán UTNMM có tính độc lập cao – bất kể tuổi, giới, thói quen nguy cơ, vị trí, giai đoạn lâm sàng cũng như độ ác tính mô học của ung thư; khi đã thành ung thư thì K4 không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như tình trạng di căn hạch, giai đoạn ung thư. Sự hằng định này của K4 có thể là một yếu tố thuận lợi để nhận diện ung thư cho dù tình huống nào.

2. Biểu hiện của dấu ấn màng đáy laminin 332 trong UTNMM và phân tích sự liên quan với lâm sàng và giải phẫu bệnh

Đa số (80%) UTNMM giảm và/hoặc không biểu hiện laminin ở màng đáy quanh các đám tế bào ung thư, bao gồm 62% có màng đáy nhưng không liên tục và 18% không có màng đáy. Giảm biểu hiện laminin ở màng đáy liên quan với tăng độ ác tính mô học ung thư ($p < 0,001$): laminin dương tính 94,6% ở nhóm grad 1, giảm còn 73% ở nhóm grad 2 và thấp nhất 60% ở nhóm grad 3.

Tỉ lệ trung bình biểu hiện laminin 332 trong bào tương các tế bào ung thư là 31,7%, với các mức độ biểu hiện: 5% độ 0; 25% độ 1; 49% độ 2 và 21% độ 3. Biểu hiện laminin trong bào tương tăng dần theo độ ác tính mô học ung thư ($p < 0,05$): từ 64,2% ở nhóm grad 1 đến 70,3% grad 2 và cao nhất 90% trong grad 3.

3. Biểu hiện dấu ấn trung mô vimentin trong UTNMM và phân tích sự liên quan với lâm sàng, giải phẫu bệnh

Tỉ lệ ung thư tế bào gai niêm mạc miệng biểu hiện dấu ấn trung mô vimentin dương tính là 47%, chủ yếu mức độ yếu (25% độ 1) và vừa (14% độ 2), ít gặp dương tính mạnh (7% độ 3 và 1% độ 4). Biểu hiện vimentin liên quan với độ ác tính mô học ung thư ($p < 0,001$): biểu hiện vimentin dương tính ($> 5\%$) tăng dần từ 34% ở nhóm grad 1, đến 52% ở nhóm grad 2, cao nhất 90% ở nhóm grad 3.

4. Liên quan biểu hiện giữa bốn dấu ấn EMT trong UTNMM

Có sự tương quan nghịch giữa biểu hiện E-cadherin và vimentin trong UTNMM. Giảm biểu hiện dấu ấn biểu mô E-cadherin và tăng biểu hiện dấu ấn trung mô vimentin trong các tế bào gai ác tính cho thấy dấu hiệu của quá trình EMT trong UTNMM ($p < 0,05$; $R = -0,2$). Có mối tương quan thuận giữa biểu hiện laminin 332 ở bào tương và biểu hiện vimentin trong UTNMM ($p < 0,05$; $R = 0,3$).

Qua khảo sát hóa mô miễn dịch với danh sách kháng thể bao phủ toàn bộ phổ chuyển dạng biểu mô – trung mô (EMT) bao gồm E-cadherin, keratin 4, laminin 332 và vimentin, nghiên cứu này đã cung cấp bằng chứng về sự hiện diện của chuyển đổi biểu mô-trung mô (EMT) trong carcinôm tế bào gai niêm mạc miệng ở người Việt Nam với giảm biểu hiện dấu ấn biểu mô E-cadherin, keratin 4 và tăng biểu hiện dấu ấn trung mô vimentin. Tỉ lệ khá cao 50,8% ung thư niêm mạc miệng đạt được kiểu hình EMT, trong đó 40,8% kiểu hình EMT một phần và 10% kiểu hình EMT hoàn toàn.

KIẾN NGHỊ

Dựa vào các kết quả trong nghiên cứu, chúng tôi xin có một số kiến nghị như sau:

1. Nhuộm hóa mô miễn dịch keratin 4 là một xét nghiệm chẩn đoán khách quan và hữu dụng, có thể ứng dụng giúp chẩn đoán sớm loạn sản và hỗ trợ thêm thông tin chẩn đoán mức độ loạn sản, đồng thời giúp phân biệt rất rõ mô ung thư với mô bình thường để xác định diện cắt phẫu thuật đủ rộng và an toàn từ đó định hướng điều trị tiếp theo phù hợp.

2. Tiếp tục nghiên cứu trong UTNMM với qui mô lớn hơn, theo dõi sau điều trị nhằm xác định và ứng dụng các giá trị chẩn đoán và tiên lượng của các dấu ấn EMT, đặc biệt là của keratin 4 trên thực tế lâm sàng, và phát triển liệu pháp nhắm trúng đích ngăn chặn hoặc can thiệp vào quá trình EMT trong ung thư để phòng ngừa hoặc điều trị sự xâm lấn và di căn của ung thư. Đây là nghiên cứu về loạn sản biểu mô miệng đầu tiên ở Việt Nam, do đó cần tiếp tục nghiên cứu loạn sản ở người không ung thư và nghiên cứu các dấu ấn EMT trong loạn sản.